技术创新

数字PCR技术检测感染者尿液中SARS-CoV-2的方法研究

王志彬，罗　庆，李宝林，唐　敏，张　章，刘靳波
西南医科大学附属医院 医学检验部（泸州　646000）

【摘　要】**目的** 建立灵敏和准确可靠的数字PCR反应体系，开发简单高效的临床检测SARS-CoV-2的分析方法，通过提高检出限，为大规模爆发的传染性疾病快速诊断提供解决方案。**方法** 提取12例病人咽拭子和尿液样本中的总RNA，以反转录后的cDNA为模板配制反应体系，经过油滴发生器将反应体系分割成油滴并进行PCR扩增，再结合荧光读取，分析检测样本中阳性核酸片段的数量。制备包含SARS-CoV-2病毒核酸片段共2 983 bp的阳性质粒，以10倍系列稀释液为模板进行RT-qPCR反应，根据标准质粒扩增结果制备标准曲线，通过标准曲线计算未知样本目的片段数量，比较ddPCR与RT-qPCR检测结果的准确性。以尿液为实验材料，检测阳性感染者尿液中病毒核酸拷贝数。**结果** 12份阳性尿液标本检出率为75%，最低检出限为5.4 copies/μL，与常规RT-qPCR相比灵敏度显著提高。**结论** ddPCR方法准确、快速，且灵敏度高，可以满足尿液标本中低拷贝核酸的快速检出。

【关键词】SARS-CoV-2；微滴式数字PCR；咽拭子；尿液；实时荧光定量PCR
【中图分类号】R446.5　　文献标志码 A　　DOI：10.3969/j.issn.2096-3351.2022.04.005

Study on the detection of SARS-CoV-2 in the urine of infected persons by droplet digital PCR

WANG Zhibin，LUO Qing，Li Baolin，TANG Min，ZHANG Zhang，LIU Jinbo
Department of Laboratory Medicine，the Affiliated Hospital of Southwest Medical University，Luzhou 646000，China

【**Abstract**】**Objective** The objective of the present study is to establish a sensitive，accurate and reliable polymerase chain reaction (PCR) platform，to develop a simple and effective analytical method to measure the SARS-CoV-2 clinically，and to provide solution of rapid diagnosis in case of outbreaks of infectious diseases through increasing the sensibility of detection limit. **Methods** The total RNA was extracted from throat swabs and urine of 12 infected people，respectively. The cDNA was used as templates and the PCR program was carried out after the generation of the droplets. The concentration of positive fragments were calculated by the droplet analyzer. Integrated with a 2 983 bp fragment of SARS-CoV-2，the pUC57 plasmid was diluted by multiples of 10 and used as templates for RT-qPCR. The standard curve was made according to the results of the amplification of the standard plasmid. The original concentration in specimen was calculated according to the standard curve. The veracity of the measurements of both ddPCR and RT-qPCR were compared，respectively. The quantity of the original copies in urine was measured through ddPCR method. **Results** The detection rate of 12 positive urine samples was 75%，and the detection limit was 5.4 copies/μL，the detection sensitivity of that was obviously higher in comparison with RT-qPCR method. **Conclusions** ddPCR is accurate，rapid and sensitive，which can meet the requirements of rapid detection of low copy nucleic acid in urine samples.

【**Key words**】SARS-CoV-2；ddPCR；Throat swab；Urine；RT-qPCR

2019年12月武汉爆发由新型冠状病毒引发的肺炎，并迅速在全国蔓延[1]，其传播速度超过2003年爆发的“非典”[2]。2020年1月10日，世界卫生组织（World Health Organization，WHO）将该病原体命名为2019-nCoV（2019 novel coronavirus），2月11日，国际病毒分类委员会（International Committee on Taxonomy of Viruses，ICTV）正式宣布该病毒为严重急性呼吸综合征冠状病毒2（severe acute respiratory syndrome coronavirus 2，SARS-CoV-2）。

SARS-CoV-2为正义链、单链线状RNA冠状病毒[3]，该病毒典型特征之一为无症状传播[4]，传染者和被传染者在感染初期可能无症状[5]，使得防控难度加大。

基金项目：四川省科技厅苗子工程培育项目（2022096）；泸州市人民政府-西南医科大学科技战略合作项目（2020LZXNYDJ46）；西南医科大学附属医院博士启动经费（19076）；西南医科大学附属医院博士后启动经费（20003）
第一作者简介：王志彬，助理研究员，博士。
通信作者：刘靳波，教授，博士。E-mail：liulab2019@163.com
引用本文：王志彬，罗庆，李宝林，等.数字PCR技术检测感染者尿液中SARS-CoV-2的方法研究[J].西南医科大学学报，2022，45（4）：301-307.
DOI：10.3969/j.issn.2096-3351.2022.04.005

疫情发生以来，中国政府及时采取强有力、高效能的措施使得疫情得到初步控制，但截至目前，SARS-CoV-2在许多国家和地区仍在快速传播和蔓延。感染者的及时确诊是疫情防控的关键一环，目前临床诊断主要基于临床病史、胸部CT和病毒核酸检测[6-7]。相较于临床症状的出现，核酸检测结果在促进感染者隔离、治疗、出院以及评估感染活动中起重要作用。根据WHO诊疗指南，目前诊断SARS-CoV-2感染的金标准是基于实时荧光定量PCR（RT-qPCR）技术的检测结果，但由于RT-qPCR技术本身的灵敏性较低，加之标本取材差异大等，许多低拷贝病毒核酸感染者不能在一次核酸检测中检出，给疫情防控带来巨大挑战[8]。

微滴式数字PCR（droplet digital PCR，ddPCR）的工作原理是由微滴发生器将20 μL RT-qPCR反应体系分割成约20 000个油包水的液滴单独进行PCR反应，再通过微滴分析仪对每个油滴进行荧光信号采集，采用泊松分布概率函数计算起始模板的拷贝数[9]。与RT-qPCR相比，ddPCR不需要绘制标准曲线即可实现绝对定量，对低拷贝核酸检出具有优势[10]。咽拭子等取样工作给医护人员带来暴露风险，尤其当防疫物资紧缺时。如果能通过尿液等标本代替咽拭子等进行核酸检测，将大大降低医护人员的暴露风险。研究报告指出，阳性病人尿液中含有SARS-CoV-2核酸[11]。本研究针对5例咽拭子阳性标本，同时进行ddPCR和RT-qPCR实验，比较了两种技术在准确性和灵敏度上的差别，建立了最佳ddPCR反应体系和反应程序；同时为了开发定量标本的采集方法进而应用于临床检验系统，使用ddPCR技术检测了另外12例阳性病人的尿液标本，评价了以尿液作为检验样本的可行性。

1 材料与方法

1.1 标本采取

2019年12月25日至2020年3月4日期间在西南医科大学附属医院发热门诊就诊病人和有武汉接触史的人群进行了SARS-CoV-2病毒检测，共收集到阳性标本17份（均属不同病人），其中包括咽拭子标本5份，尿液标本（随机尿）12份。病人纳入标准依据《新型冠状病毒肺炎诊疗方案（试行第七版）》[12]中病原学检测标准：标本收集之前病人尚未接受药物治疗以及其他治疗，标本收集后RT-PCR检测结果阳性。

1.2 仪器与试剂

仪器：EX3600核酸自动提取仪（上海之江生物科技股份有限公司）、Bio-Rad CFX96实时荧光定量PCR仪（美国Bio-rad公司）、Bio-Rad QX200微滴式数字PCR系统（美国Bio-rad公司）。

试剂：Bio-Rad Droplet Generation Oil（美国Bio-rad公司）、Bio-Rad Droplet Reader Oil（美国Bio-rad公司）、Bio-Rad 2× ddPCR supermix for probes（美国Bio-rad公司）、引物（中国生工）、探针（中国生工）、新型冠状病毒2019-nCoV核酸检测试剂盒（上海之江生物科技股份有限公司）。

1.3 方法

本文的方法学研究主要参照康凤凤等[13]和黄斐等[14]的报道，并参考2012年6月美国临床和实验室标准研究院颁布的EP17-A2文件[15]。

1.3.1 核酸提取 咽拭子SARS-CoV-2 RNA的提取：取3倍于咽拭子体积的4% NaOH溶液，加入咽拭子采集管中液化30 min，液化过程中每10 min振荡一次，直至样本无拉丝。取1 mL液化后样本于13 000 rpm离心10 min，弃上清后用生理盐水洗涤，13 000 rpm离心10 min，留取300 μL上清，弃除多余的上清后将剩余的300 μL上清与沉淀混匀，将混合物吸入到EX3600核酸自动提取仪配套的核酸提取预装板A孔中（一次性可以提取36个标本），将预装版置于设备固定位置，启动核酸提取程序提取核酸。

尿液SARS-CoV-2 RNA的提取：取尿液1.5 mL，8 000 rpm离心5 min，弃上清1.2 mL，剩余混匀后进行核酸提取，具体步骤同上。

1.3.2 标准质粒制备与稀释 CDC-阳性质粒V2，全长2 983 bp，载体pUC57，由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。标准质粒起始浓度为7.84×10^{10} copies/μL。用ddH_2O将标准质粒做10倍系列稀释，共7个浓度（7.84×10^{7} copies/μL～7.84×10^{1} copies/μL）。

1.3.3 引物和探针 引物序列采用国家微生物科学数据中心（National Microbiology Data Center，NMDC）公布的信息，目的序列为新冠肺炎SARS-CoV-2病毒核壳蛋白（nucleoprotein，N）基因，序列信息见表1。

1.3.4 ddPCR反应体系和条件优化 进行ddPCR之前，通过温度梯度PCR，设置51 ℃～62 ℃之间不同的温度对退火温度进行优化。使用Bio-Rad QX200微滴

表1 SARS-CoV-2病毒核壳蛋白基因引物信息

Table 1 Primer information of SARS-CoV-2 virus nucleocapsid protein gene

基因名称	引物序列	探针	目的片段（bp）
核壳蛋白基因	前引物：5′-GGGGAACTTCTCCTGCTAGAAT-3′ 后引物：5′-CAGACATTTTGCTCTCAAGCTG-3′	5′-FAM-TTGCTGCTGCTTGACAGATT-TAMRA-3′	99

式数字PCR系统进行实验，具体操作步骤参照实验仪器及试剂说明书，略有改动，主要包括PCR反应体系制备（见表2）、微滴发生、PCR反应程序设定和微滴信号检测等。

表2　ddPCR反应体系

Table 2　ddPCR reaction system

组分	体积(μL)
2×ddPCR supermix for probes(no dUTP)	10.0
前引物(10 μM)	1.8
后引物(10 μM)	1.8
探针(10 μM)	0.5
cDNA 模板	1.0
ddH2O	4.9

将上述反应体系混匀后加入微滴发生卡中间一排，在微滴发生卡Oil标志列加入70 μL微滴生成油，及时盖好专用胶垫后将微滴发生卡水平放置在微滴发生器的槽中制备油滴，待指示灯亮后取出微滴发生卡，将droplet列微滴（约45 μL）全部转入96孔板，封铝膜后置于PCR仪中进行扩增。扩增程序为：95 ℃ 10 min，94 ℃ 30 s，60 ℃ 1 min，温度变化设置为2 ℃，共40个循环；扩增结束后98 ℃酶失活10 min。每个模板设置2个技术重复。扩增结束后，将96孔板放入微滴读取仪中检测探针信号，并使用QuantaSoft软件（Bio-Rad，USA）分析数据。

1.3.5 *假病毒样本的ddPCR扩增*　假病毒、阳性对照和阴性对照均来自新型冠状病毒2019-nCoV核酸检测试剂盒（上海之江生物科技股份有限公司）。假病毒标准溶液浓度为10^8 copies/mL，分别稀释为10^5 copies/μL、10^4 copies/μL、10^3 copies/μL、10^2 copies/μL、10 copies/μL和1 copies/μL，共6个浓度进行重复性实验。假病毒核酸稀释后，在最佳反应条件下进行ddPCR扩增。每次反应中设置一个阴性对照和一个空白对照。将反应体系离心混匀，放入微滴发生卡中，通过微滴发生器产生微滴，之后将制备好的微滴（水、油分层）缓慢加入96孔板，进行PCR反应。反应程序同上，每个假病毒标本均做3个相同模板的平行反应。

1.3.6 *空白限评估*　空白限评估(limit of blank，LOB)：参照黄斐等[14]的研究方法，检测8份（3次重复）不同浓度阴性样本核酸中SARS-CoV-2的拷贝数，计算应用该检测平台可能出现的假阳性微滴数及概率大小。

1.3.7 *统计学分析*　本研究采用SPSS17.0软件进行统计学分析，实验所得数据以均数±标准差表示，采用两组独立实验的t检验方法比较两组间差异性。

2　结果

2.1　阳性质控制备与引物特异性验证

通过温度梯度PCR，退火温度设为51℃～62 ℃，确定引物的最佳退火温度为60 ℃。以稀释后的7个不同浓度质粒为模板，以核壳蛋白基因序列为目的基因，验证引物特异性并确定阳性质控的最佳浓度。RT-qPCR结果显示见图1，每两个相邻浓度模板之间扩增曲线相差约3.3个循环，除模板浓度（编号g）（7.84×10^1 copies/μL）的Ct值大于30之外，其余各浓度模板扩增曲线扩增效率良好。阴性对照无扩增，表明该体系无污染。

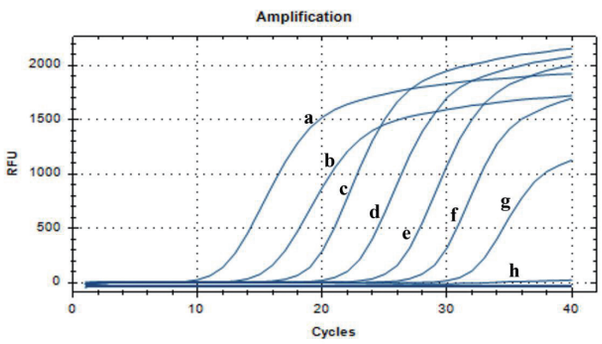


图1　不同浓度CDC-阳性质粒V2模板扩增曲线

Figure 1　Amplification curve of CDC- positive plasmid V2 template at different concentrations

注：a～g分别代表7.84×10^7 copies/μL、7.84×10^6 copies/μL、7.84×10^5 copies/μL、7.84×10^4 copies/μL、7.84×10^3 copies/μL、7.84×10^2 copies/μL和7.84×10^1 copies/μL 7个浓度，h为阴性对照，模板为ddH_2O

不同浓度质粒模板经40个循环扩增后，溶解曲线为单峰见图2，无引物二聚体及其它非特异性扩增，表明引物特异性良好，能用于SARS-CoV-2的检验。

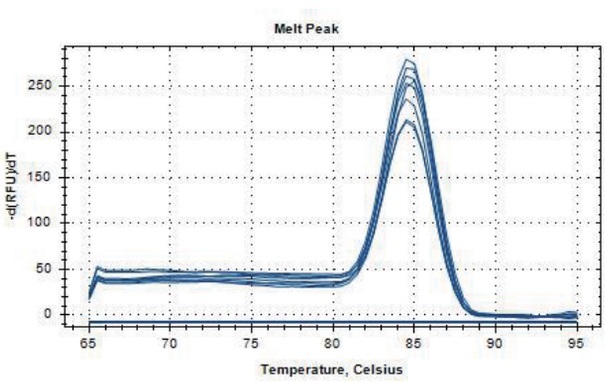


图2　不同浓度CDC-阳性质粒V2模板溶解曲线

Figure 2　Template dissolution curves of CDC- positive plasmid V2 at different concentrations

2.2　ddPCR反应检测结果的精密度评价

以上述7个不同浓度的阳性质粒为模板进行ddPCR反应。结果显示，以阳性质粒为模板（3.92×10^4 copies/μL）进行ddPCR扩增，微滴发生器生成的微滴数大于10 000，见图3。在阴性对照中，无阳性液滴生成，表明反应体系和微滴发生程序正常，能满足基本扩增和检测。

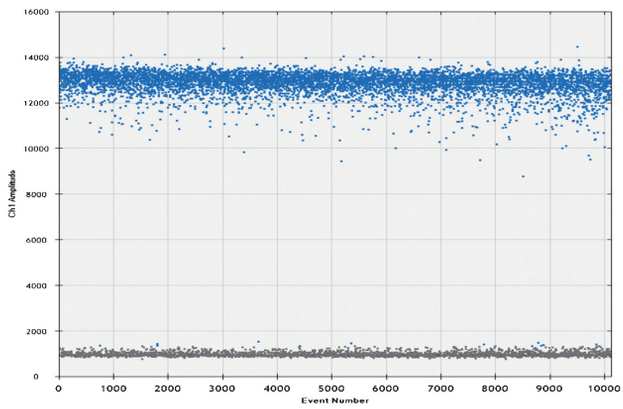


图3　ddPCR方法扩增CDC-阳性质粒V2模板一维散点图

Figure 3　One dimensional scatter diagram of CDC-positive plasmid V2 template amplified by ddPCR

ddPCR可靠性检测结果显示：所有反应中油滴总数均超过10 000，最低数量为11 343，最高数量为15 136，表明该数字PCR平台运转良好，微滴生成数量能够满足泊松分布函数。与质粒模板的理论浓度相比，ddPCR检测结果较理论值偏低，见表3。两个机械重复之间相比较，ddPCR结果重复性较好。ddPCR检测结果的变异系数CV值介于0.04～12.09，表明ddPCR检测结果的准确度较好。

以ddPCR检出结果和质粒标准浓度之间做相关性分析，结果显示两者之间具有极强的相关性，两者之间的线性关系见图4，ddPCR检出结果与理论值呈极度正相关，ddPCR结果正确可靠。当模板浓度超过7.84×10^5 copies/μL时，微滴分析仪读取不到阴性微滴，全部体系均为阳性微滴，超过机器检出限，导致读取结果错误，ddPCR检测上限应低于7.84×10^5 copies/μL。

表3　核壳蛋白基因的ddPCR精密度检验

Table 3　ddPCR precision test of nucleoprotein gene

CDC-阳性质粒(copies/μL)	阳性微滴数	阴性微滴数	微滴总数	检出浓度(copies/μL)	平均值 ± SD	偏差(%)
7.84×10^4	13 353	1 193	14 546	58 840	58 820.00 ± 28.28	−24.98
	11 435	1 023	12 458	58 800		
7.84×10^3	2 900	10 301	13 201	5 840	5 960.00 ± 169.71	−23.98
	3 281	11 136	14 417	6 080		
7.84×10^2	313	14 823	15 136	492	538.00 ± 65.05	−31.38
	362	14 408	14 770	584		
7.84×10^1	27	11 316	11 343	56	59.00 ± 4.24	−24.75
	33	12 550	12 583	62		
0	0	12 866	12 866	No call		
	0	13 247	13 247	No call		

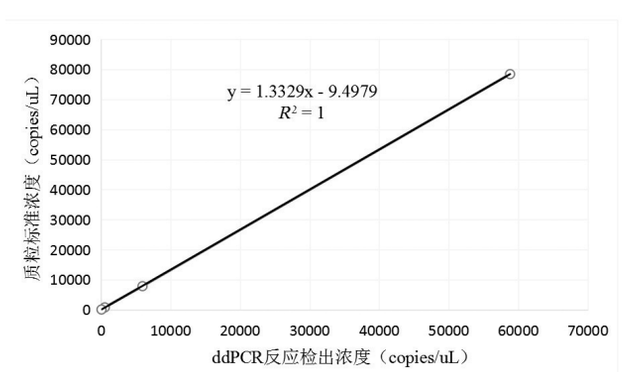


图4　ddPCR方法与RT-qPCR之间的线性相关性

Figure 4　Linear correlation between ddPCR and RT-qPCR

2.3　ddPCR反应与RT-qPCR反应组间重复

将标准质粒的7个浓度稀释液作为模板，以核壳蛋白(nucleoprotein，N)基因为为目的序列设计引物，进行RT-qPCR反应，构建的标准曲线为：y = −3.317lgx + 39.831，线性相关系数为R^2 = 0.999，y为Ct值，x为浓度(copies/μL)。根据此标准曲线，通过对未知样本测定的Ct值便可得出样本中SARS-CoV-2的起始拷贝数，见表4。

2.4　ddPCR反应重复性和可报告范围

在重复性分析实验中，ddPCR定量检测中CV最小值为2.31%，最大值为38.35%，结果表明，ddPCR方法具有较好的重复性。不同浓度假病毒方法间重复实验结果表明，该平台系统偏差为−17.33%～−3.80%，见表5。在重复性实验中，使用ddPCR检测到的所有结果均未超出假病毒标准品的理论浓度，表现出较高的一致性。

2.5　空白限评估

ddPCR检测阴性标本核酸中SARS-CoV-2拷贝数，结果发现不同浓度(随机)样本产生的微滴数在11 101～14 805之间，阳性微滴数＞1即判断为假阳性，在本实验中该平台假阳性出现概率为1/24。LOB最大估计值为0.09 copies/μL。

2.6　尿液标本中SARS-CoV-2拷贝数检测

为了能使标本量化检测，同时避免咽拭子等取样工作带来的暴露风险，本研究尝试用尿液检测SARS-CoV-2。12份尿液标本全部来自确诊病人。临床上使用某公司生产的核酸检测试剂盒检测病人痰液SARS-

表4　ddPCR与RT-qPCR之间的组间重复

Table 4　Intergroup duplication between ddPCR and RT-qPCR

	ddPCR					RT-qPCR		
样本	阳性微滴数	阴性微滴数	微滴总数	检出浓度（copies/μL）	平均值 ± SD	Ct值	检出浓度（copies/μL）	平均值 ± SD
咽拭子1	5	11 847	11 852	10	9.00 ± 1.41	35.20	2.49	2.45 ± 0.05
	4	11 694	11 698	8		35.24	2.42	
咽拭子2	12	13 686	13 698	20.6	25.30 ± 6.65	33.44	8.45	8.34 ± 0.16
	19	14 824	14 843	30		33.48	8.22	
咽拭子3	4	15 167	15 171	6.2	26.10 ± 28.14	34.98	2.90	3.62 ± 1.02
	34	17 359	17 393	46		34.40	4.34	
咽拭子4	7	6 693	6 700	24	37.00 ± 18.38	36.22	1.23	1.41 ± 0.26
	29	13 818	13 847	50		35.84	1.60	
咽拭子5	18	12 250	12 268	34	22.30 ± 16.55	35.72	1.74	1.68 ± 0.08
	6	13 282	13 288	10.6		35.82	1.62	

注：ddPCR检测结果比RT-qPCR检测结果更加灵敏，但其每两次重复之间标准差较大，说明ddPCR方法精密度较RT-qPCR弱

表5　不同浓度假病毒样本ddPCR方法组间重复

Table 5　The ddPCR method of pseudovirus samples with different concentrations were repeated between groups

阳性微滴数	阴性微滴数	微滴总数	检出浓度(copies/μL)	平均值 ± SD	偏差(%)
9 703	968	10 671	84 480		
9 188	2 298	11 486	83 740	82 673.33 ± 2 515.74	−17.33
8 027	4 056	12 083	79 800		
1 988	10 334	12 322	8 980		
2 440	7 741	10 181	9 400	9 210.00 ± 212.84	−7.90
2 128	10 339	12 467	9 250		
369	10 901	11 270	898		
403	11 019	11 422	989	963.33 ± 57.01	−3.80
411	9 855	10 266	1 003		
37	14 009	14 046	79		
41	12 102	12 143	83	83.00 ± 4.00	−17.00
43	14 161	14 204	87		
3	12 267	12 270	8.2		
4	12 556	12 560	8.4	8.90 ± 1.04	−16.50
7	13 139	13 146	10.1		
0	12 604	12 604	未检出		
4	12 613	12 617	7.5	5.90 ± 2.26	
1	11 528	11 529	4.3		
0	11 519	11 519	未检出		
0	12 336	12 336	未检出		
0	9 637	9 637	未检出		
0	12 334	12 334	未检出		
0	11 476	11 476	未检出		
0	12 058	12 058	未检出		

注：样本编号1～6为假病毒不同浓度稀释液，其浓度分别为10^5 copies/μL、10^4 copies/μL、10^3 copies/μL、10^2 copies/μL、10 copies/μL和1 copies/μL，阴性对照来自新型冠状病毒2019-nCoV核酸检测试剂盒（上海之江生物科技股份有限公司），ddH_2O为空白对照

CoV-2阳性，而检测尿液结果全部为阴性，表明尿液中该病毒核酸为低拷贝。

使用ddPCR检测这12份尿液样本，其灵敏度增加，共9例检出，3例未检出，检出率为75%。所检出浓度范围为5.4 copies/μL ~ 30 copies/μL。

从图5、图6可以看出，阴性对照均无阳性微滴检出，阳性对照分别检出阳性微滴数2 226和2 561，分别对应检出浓度为4 520 copies/μL和5 500 copies/μL。

尿液标本同时使用RT-qPCR和ddPCR进行检测，结果12份尿液标本使用ddPCR技术检出9份，使用RT-qPCR检出0份，表明ddPCR方法在低拷贝核酸定量检测中具有明显优势。

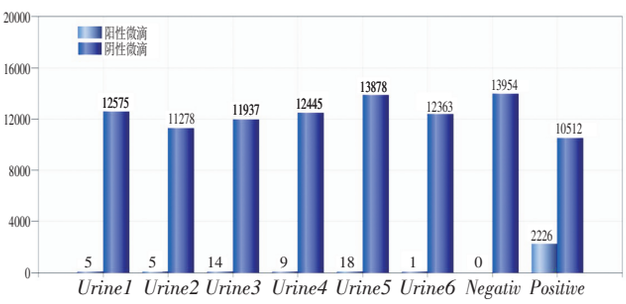


图5　尿液标本1～6号检测结果

Figure 5　Detection results of urine samples 1～6

注：Negative为阴性对照，模板为1 μL ddH2O；Positive为阳性对照，模板为1 μL 7.84 × 10^3 copies/μL的阳性质粒

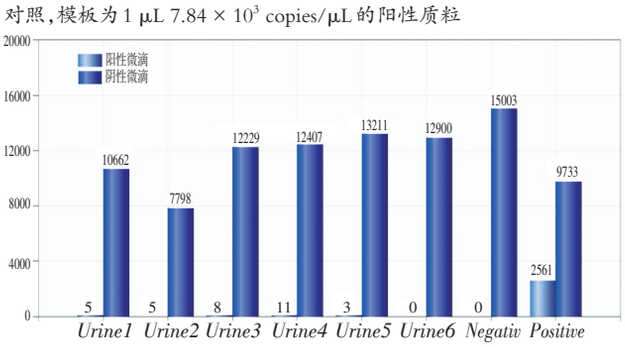


图6　尿液标本7～12号检测结果

Figure 6　Detection results of urine samples 7～12

注：Positive为阳性对照，模板为1 μL 7.84 × 10^3 copies/μL的阳性质粒

3　讨论

SARS-CoV-2爆发以来，中国政府及时采取强有力的防控措施，使得疫情得到初步控制。但是，SARS-CoV-2在许多国家和地区还有蔓延趋势。研究报告表明，关于该病毒的致病性、遗传特征等方面的认知相对缺乏[15]，因此很难在短时间内制定一套有效的治疗方案，而快速诊断疑似病人并采取隔离防控措施，成为疫情防控的关键。

SARS-CoV-2传播能力强而且存在无症状感染的特性。相比于CT（computed tomography）或抗体检测，核酸检测克服了滞后性，同时也是目前临床上感染者确诊和出院的主要依据[16]。但核酸检测易出现假阴性，标本采集部位、方法以及RNA提取等过程均是SARS-CoV-2病毒核酸检测出现假阴性的原因[8]。另外，RT-qPCR由于其检出限的限制，在临床上的应用弊端日渐突出，加之不同公司生产的试剂盒质量差别很大，致使许多疑似病例甚至阳性感染者无法在第一时间检出阳性结果，从而导致诊断延迟，给疫情防控带来巨大挑战。

ddPCR技术优势明显，是继常规PCR技术发展起来的一项精密检测技术，最初ddPCR技术被用来分离单基因[17-18]，在临床检验中使用较少。有报道指出，当ddPCR应用于检测系统时，能够检测到低至0.001%的突变基因，相比于RT-qPCR，灵敏性提高1 000倍[19]。赵欣[20]的研究结果显示，ddPCR在临床样本定量检测时其检出率高于RT-qPCR，这与本研究得出结果相同。本研究中，RT-qPCR可检出4号咽拭子中1.41 copies/μL的SARS-CoV-2，却无法检出尿液中5.4 ~ 30 copies/μL（ddPCR检出值）的SARS-CoV-2。假设上述两种方法检出值都在真值范围内，这一现象无法仅仅以“尿液中该病毒核酸为低拷贝”作出解释。回到RT-qPCR检测，在临床上针对新冠病毒的“判阳”是依据Ct值大小，如第九版新冠肺炎诊疗方案中明确规定连续两次新冠核酸检测Ct值≥35即可解除隔离或出院。在本研究中，4号咽拭子中核酸浓度1.41 copies/μL对应的Ct值为36.03，通过常规PCR技术检测应该判定为阴性，而ddPCR与之相对应的检测结果为37.00 copies/μL。由此可见，ddPCR检测可以补充RT-qPCR检测结果，而RT-qPCR不能补充ddPCR的检测结果。因此，当ddPCR检测结果为5.4 ~ 30 copies/μL时，RT-qPCR无法检出就得到了很好的解释。RT-qPCR检出浓度是根据Ct value带入标准曲线计算所得，为理论值，4号咽拭子Ct值两次重复均超过35，随着Ct值增大，结果准确性降低，国家微生物科学数据中心指南（https://nmdc.cn/nCoV）表明当RT-qPCR结果大于37，为不准确。ddPCR将含有核酸分子的反应体系分隔成“油包水”的小液滴，在模板量适当的前提下，确保每个小液滴最多包含一条核酸分子，经PCR扩增后，利用微滴检测仪对每个微滴进行逐个扫描检测，有荧光信号的微滴判读为“1”，没有荧光信号的微滴判读为“0”，最后根据泊松分布原理及阳性微滴的个数，分析软件即可给出靶分子的绝对起始拷贝数及浓度，这个浓度的准确性有待进一步探讨，赵欣在其硕士论文中也表示，RT-qPCR的定量值始终比ddPCR高10倍，推测其原因可能是标准质粒浓度被高估所致[20]。

临床上核酸检测SARS-CoV-2的取样主要包括鼻咽拭子、口咽拭子、痰液等，当感染者病毒载量低时不能取到阳性标本，加之医护人员取样操作带来的差异，导致所取样本无法量化，也是核酸检测假阴性的原因之一。同时，咽拭子取样操作使得医护人员暴露风险

增加，在防护物资紧缺时增加医护人员的感染风险。有研究表明新型冠状病毒还会导致不同程度的心理抑郁[21]，因此快速、准确检出病毒，是疫情防控关键的一环。本研究开发新的取样方法和标本内容，以尿液为实验材料，定量至1.5 mL进行实验，以期在保证阳性检出率的同时，更加安全的进行传染性疾病的取样工作，更完整地鉴定感染病例并避免交叉感染。

在低拷贝核酸样本的检测中，ddPCR技术与RT-qPCR相比具有显著的优势[22-24]。临床上根据检测结果进行的确诊，不同试剂盒厂家建议只需满足在同一份标本中SARS-CoV-2的*ORF1ab*基因及核壳蛋白基因至少1个靶标特异性RT-PCR检测结果为阳性即可，并且有研究报告指出，在检测SARS冠状病毒时，*ORF1b*基因和核壳蛋白基因具有相似的准确性[25]，因此本研究主要以核壳蛋白基因为靶序列。虽然本研究证实，单拷贝核酸通过ddPCR技术检测具有优越的灵敏性，但本研究依然存在局限性。①由于泸州本地阳性病例较少，使得本研究样本量不够大，重复性不好；②ddPCR仪器操作要求较高，很容易在不同的加样孔之间造成污染；③ddPCR检测成本较RT-qPCR技术高，普及困难。本研究的结果显示，12例痰液检测为阳性的感染者尿液标本，RT-qPCR检出0例，表明尿液中病毒载量低。ddPCR技术检出9例，表明ddPCR技术在低载量病毒核酸检测过程中具明显优势，这也为其他重大传染性疾病的检出提供新的思路与方法，其自动化程度是值得继续研究与开发的方向。

4 结论

在低拷贝核酸样本的检测中，ddPCR技术与RT-qPCR相比，ddPCR技术在低载量病毒核酸检测过程中具有明显优势。这一结果也为其他类似的重大传染性疾病的检出提供了新的思路与方法。

（利益冲突：无）

参 考 文 献

[1] WANG DW, HU B, HU C, *et al*. Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus-infected pneumonia in Wuhan, China[J]. JAMA, 2020, 323(11): 1061-1069.

[2] ZENG TY, ZHANG YN, LI ZY, *et al*. Predictions of 2019-nCoV transmission ending via comprehensive methods[J]. arXiv, 2020. DOI: 10.48550/arXiv.2002.04945.

[3] CHEN Y, CHENG J, JIANG Y, *et al*. A time delay dynamical model for outbreak of 2019-nCoV and the parameter identification[J]. J Inverse Ill Posed Probl, 2020, 28(2): 243-250.

[4] CHAN JFW, YUAN SF, KOK KH, *et al*. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster[J]. Lancet, 2020, 395(10223): 514-523.

[5] CHEN NS, ZHOU M, DONG X, *et al*. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study[J]. Lancet, 2020, 395(10223): 507-513.

[6] 李宝林，杨葵，宋敏，等. 大型三甲医院检验科COVID-19疫情应对策略[J]. 西南医科大学学报，2020，43(3): 222-224，237.

[7] XIAO SY, WU YJ, LIU H. Evolving status of the 2019 novel coronavirus infection: proposal of conventional serologic assays for disease diagnosis and infection monitoring[J]. J Med Virol, 2020, 92(5): 464-467.

[8] 里进，叶光明，陈良君，等. 新型冠状病毒核酸检测假阴性结果原因分析及对策[J]. 中华检验医学杂志，2020，43(3): 221-225.

[9] PINHEIRO LB, COLEMAN VA, HINDSON CM, *et al*. Evaluation of a droplet digital polymerase chain reaction format for DNA copy number quantification[J]. Anal Chem, 2012, 84(2): 1003-1011.

[10] HINDSON CM, CHEVILLET JR, BRIGGS HA, *et al*. Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR[J]. Nat Methods, 2013, 10(10): 1003-1005.

[11] SUN J, ZHU AR, LI HY, *et al*. Isolation of infectious SARS-CoV-2 from urine of a COVID-19 patient[J]. Emerg Microbes Infect, 2020, 9(1): 991-993.

[12] 新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案(试行第五版)[J/OL]. 中国中西医结合杂志: 1-3[2022-02-14]. http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2787.R.20200208.1034.002.html.

[13] 康凤凤，王薇，王治国. 临床实验室检测方法空白限、检出限和定量限评价新方法[J]. 中国卫生统计，2014，31(5): 901-904.

[14] 黄斐，虞倩，吴炯，等. 数字PCR检测非小细胞肺癌患者血浆EGFR基因T790M突变平台的建立[J]. 中华检验医学杂志，2016，39(3): 170-175.

[15] CLSI. Evaluation of detection capability for clinical laboratory measurement procedures; approved guideline-second edition: CLSI document EP-17 A2[S]. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards institute, 2012.

[16] HAN Y, YANG HL. The transmission and diagnosis of 2019 novel coronavirus infection disease (COVID-19): a Chinese perspective[J]. J Med Virol, 2020, 92(6): 639-644.

[17] HU ZL, SONG C, XU CJ, *et al*. Clinical characteristics of 24 asymptomatic infections with COVID-19 screened among close contacts in Nanjing, China[J]. Sci China Life Sci, 2020, 63(5): 706-711.

[18] 张礼堃，邹秉杰，宋沁馨，等. PCR技术在新冠病毒核酸检测中的应用[J]. 医学研究生学报，2021，34(5): 539-544.

[19] HÄRMÄLÄ SK, BUTCHER R, ROBERTS CH. Copy number variation analysis by droplet digital PCR[J]. Methods Mol Biol, 2017, 1654: 135-149.

[20] 赵欣. 鲤疱疹病毒2型ddPCR检测方法的建立及其抗体库的筛选[D]. 武汉：华中农业大学，2016.

[21] 黄敏，何容芳，刘可智，等. 新冠肺炎患者心理状态评估及应对方式探讨[J]. 西南医科大学学报，2021，44(6): 665-670.

[22] JONES M, WILLIAMS J, GÄRTNER K, *et al*. Low copy target detection by Droplet Digital PCR through application of a novel open access bioinformatic pipeline, ´definetherain´[J]. J Virol Methods, 2014, 202(100): 46-53.

[23] SUO T, LIU XJ, FENG JP, *et al*. ddPCR: a more accurate tool for SARS-CoV-2 detection in low viral load specimens[J]. Emerg Microbes Infect, 2020, 9(1): 1259-1268.

[24] CARBALLAR-LEJARAZÚ R, KELSEY A, PHAM TB, *et al*. Digital droplet PCR and IDAA for the detection of CRISPR indel edits in the malaria species Anopheles stephensi[J]. Biotechniques, 2020, 68(4): 172-179.

[25] POON LLM, CHAN KH, WONG OK, *et al*. Detection of SARS coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome by conventional and real-time quantitative reverse transcription-PCR assays[J]. Clin Chem, 2004, 50(1): 67-72.

（2021-03-12 收稿，2022-05-05 修回）